

[中药指纹图谱]

# 广金钱草 HPLC 指纹图谱的研究

陈思妮， 张振秋\*  
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

关键词: 广金钱草; 指纹图谱; 高效液相色谱法

摘要: 目的: 采用高效液相色谱法对来自 11 个地区广金钱草药材进行指纹图谱研究, 为广金钱草药材质量控制提供依据。方法: 采用 Phenomasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 272 nm。结果: 以 11 个共有峰为评价指标, 精密度和重复性试验中各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 11 批样品相似度大于 0.9。结论: 此方法精密度高、稳定性和重复性良好, 有助于广金钱草药材的质量控制。

中图分类号: R284.1      文献标识码: A      文章编号: 1001-1528(2008)09-1249-04

## Fingerprint of *Desmodium styracifolium* by HPLC

CHEN Sini    ZHANG Zhen-qiu  
(Pharmacology School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**KEY WORDS** *Desmodium styracifolium*; fingerprint; HPLC

**ABSTRACT** **AM:** The fingerprint chromatograms were established for quality evaluation of *Desmodium styracifolium* collected from 11 areas by HPLC. **METHODS** The analysis was performed on a Phenomasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-methanol-water as mobile phase in a gradient mode at a flow rate of 1.0 mL/min and at a column temperature of 25℃. The detection wavelength was at 272 nm. **RESULTS** 11 peaks were selected as the common fingerprint peaks. The relative standard deviations for relative retention values and relative peak areas were less than 3% in the precision and repeated test; the similarity of 11 batches of samples were no less than 0.9. **CONCLUSION:** The method is reliable and can be helpful on the quality control of *Desmodium styracifolium*.

广金钱草为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr 的干燥地上部分。始载于《岭南草药志》，为常用中药。主产于我国广东省，具有清热除湿，利尿通淋之功效。用于治疗各种淋证，水肿等疾病历史悠久。含黄酮类，生物碱类，皂苷类，酚类等成分。《中华人民共和国药典》只收载了广金钱草中黄酮，生物碱的检查方法，且其混用品种数量繁多，为其制定质量可控的标准带来了困难。本试验采用反相高效液相色谱法，建立广金钱草药材的指纹图谱，并对不同来源的广金钱草药材进行比较研究，为其鉴别与质量控制提供了参考。

**1 仪器与试药**

1.1 仪器 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪，Phenomasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱分析柱。UV-3050 型紫外

可见分光光度计，AR2140 电子分析天平，AS3120A 超声波清洗器。

1.2 药品与试药 芦丁对照品 (批号 100080-200306)、连钱草、积雪草和金钱草对照药材均购于中国药品生物制品检定所。乙腈、甲醇为色谱纯，水为重蒸馏水，其它试剂均为分析纯。实验中所用广金钱草购自我国十一个地区，经辽宁中医药大学李峰教授鉴定均为豆科山蚂蝗属植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr 的干燥地上部分。来源见表 1。

**2 方法与结果**

2.1 色谱条件及系统适用性 色谱柱 Phenomasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 乙腈 (A)-水 (B)-甲醇 (C) 为流动相梯度洗脱: 0 ~ 10 min (10% A-85% B-5% C), 20 min (10% A-

收稿日期: 2007-05-10

作者简介: 陈思妮 (1983-), 女, 硕士生, 主要从事中药药物分析的研究。E-mail: cc\_83131@163.com

\* 通讯作者: 张振秋, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药物分析研究。电话: 0411-87586058

82% B-8% C), 30 m in( 12% A-80% B-8% C), 60 m in( 17% A-75% B-8% C)。流速 1. 0 mL/m in 柱温 25℃, 检测波长 272 nm, 进样量 20 μL。

表 1 不同产地广金钱草来源

| 序号 | 来源  | 收集时间    | 备注   |
|----|-----|---------|------|
| 1  | 北京  | 2006 01 | 茎叶混杂 |
| 2  | 杭州  | 2006 01 | 茎叶混杂 |
| 3  | 哈尔滨 | 2006 01 | 茎叶混杂 |
| 4  | 天津  | 2006 01 | 茎叶混杂 |
| 5  | 安国  | 2006 01 | 茎叶混杂 |
| 6  | 广州  | 2006 01 | 茎叶混杂 |
| 7  | 温州  | 2006 03 | 茎叶混杂 |
| 8  | 沈阳  | 2006 03 | 茎叶混杂 |
| 9  | 大连  | 2007 03 | 茎叶混杂 |
| 10 | 深圳  | 2007 03 | 茎叶混杂 |
| 11 | 南宁  | 2007 03 | 茎叶混杂 |

2.2 内标物溶液的制备 取芦丁对照品适量,用 60% 甲醇制成每 1 mL 含 1.252 4 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取各批广金钱草药材粉末和连钱草、积雪草、金钱草粉末(过 2 号筛)约 1.0 g 精密称定,置于锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇溶液 20 mL,超声处理 30 m in 放冷,再称定重量,用 60% 甲醇溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 3 mL 于 5 mL 量瓶中,精密加入内标物溶液 1 mL,加 60% 的甲醇至刻度,即得。

2.4 测定方法 分别精密吸取供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,记录 60 m in 色谱图即得。内标物及广金钱草药材 HPLC 指纹图谱见图 1,图 2。

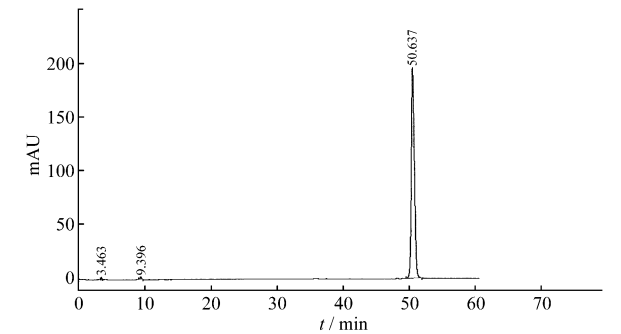


图 1 芦丁内标物色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of rutin

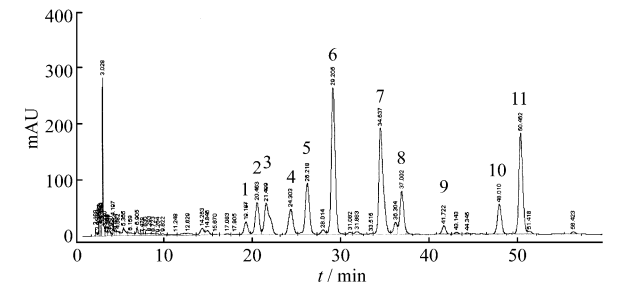


图 2 广金钱草对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprint of *Desmodium styracifolium*

2.5 精密度试验 取 1 号药材制备的同一供试品溶液,连续进样 5 次。结果表明,色谱图中各色谱峰的相对保留时间的 RSD 小于 2%; 相对峰面积的 RSD 小于 5%, 符合指纹图谱要求,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取 1 号药材制备的同一供试品溶液,分别在 Q 1、2、6、12、24 h 进样测定,结果表明,各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 小于 2%, 相对峰面积的 RSD 小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取 1 号药材 5 份,每份约 1.0 g 精密称定,照供试品溶液制备方法制备,进样检测,结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD 小于 2%; 相对峰面积的 RSD 小于 4%, 表明方法的重复性良好。

2.8 指纹图谱的建立及分析

2.8.1 广金钱草药材 HPLC 指纹图谱中共有峰的标定 将 11 批广金钱草药材的指纹图谱进行匹配(见图 3), 结果表明 1~11 号峰在 11 批样品的色谱图中均出现。因此标定此 11 个峰为共有指纹峰,并据此建立广金钱草药材的 HPLC 指纹图谱。

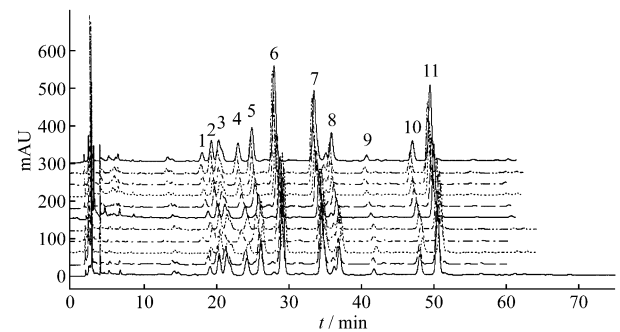


图 3 11 批不同来源广金钱草药材的指纹图谱

Fig 3 HPLC Fingerprint of 11 batches of samples

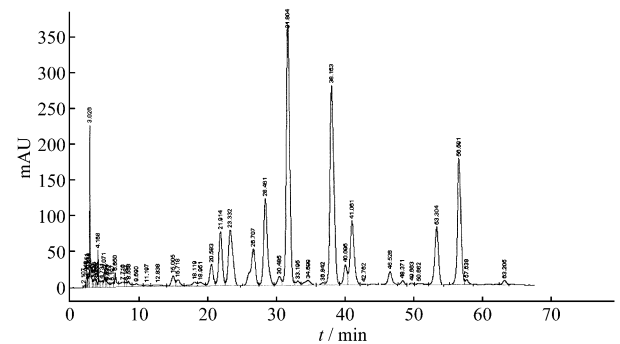


图 4 广金钱草叶指纹图谱

Fig 4 HPLC Fingerprint of leaf

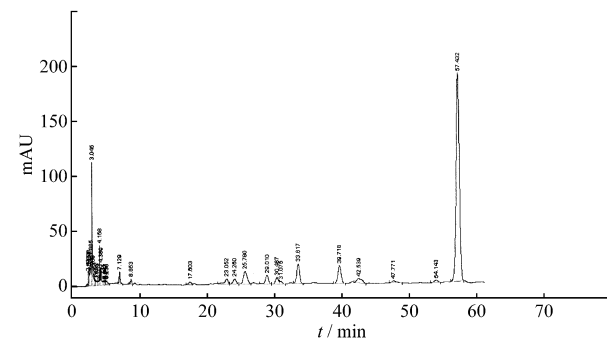
2.8.2 共有指纹峰保留时间和峰面积与参照物保留时间和峰面积的比值 以芦丁色谱峰的保留时间和峰面积为 1, 计算其它各峰的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间的 RSD 小于 3.0% (n= 11, 结果见表 2)。相对峰面积结果见表 3。由表 3 和图 4 可见, 各批供试品指纹图谱的重现性较好, 但各批样品间共有指纹峰的相对峰面积有一定差异。

表 2 11批广金钱草药材共有特征指纹峰的相对保留时间

| 峰号 | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 均值   | RSD% |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1  | 0.38 | 0.38 | 0.38 | 0.36 | 0.38 | 0.38 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 0.37 | 1.9  |
| 2  | 0.41 | 0.40 | 0.41 | 0.39 | 0.41 | 0.41 | 0.40 | 0.40 | 0.39 | 0.40 | 0.39 | 0.40 | 2.1  |
| 3  | 0.42 | 0.42 | 0.43 | 0.41 | 0.42 | 0.43 | 0.42 | 0.42 | 0.41 | 0.42 | 0.41 | 0.42 | 1.9  |
| 4  | 0.48 | 0.48 | 0.48 | 0.46 | 0.48 | 0.48 | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 1.5  |
| 5  | 0.52 | 0.52 | 0.55 | 0.50 | 0.52 | 0.52 | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.52 | 2.5  |
| 6  | 0.58 | 0.58 | 0.58 | 0.57 | 0.58 | 0.58 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 1.0  |
| 7  | 0.69 | 0.68 | 0.69 | 0.68 | 0.69 | 0.69 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.68 | 0.8  |
| 8  | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.73 | 0.0  |
| 9  | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.82 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.82 | 0.83 | 0.7  |
| 10 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.95 | 0.0  |
| 11 | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 0.0  |

表 3 11批广金钱草药材共有指纹图谱峰的相对峰面积

| 峰号 | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1  | 0.14 | 0.12 | 0.09 | 0.08 | 0.11 | 0.08 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.13 | 0.11 |
| 2  | 0.33 | 0.26 | 0.28 | 0.26 | 0.28 | 0.18 | 0.26 | 0.19 | 0.23 | 0.30 | 0.26 |
| 3  | 0.46 | 0.36 | 0.19 | 0.33 | 0.33 | 0.26 | 0.32 | 0.27 | 0.34 | 0.44 | 0.39 |
| 4  | 0.31 | 0.24 | 0.19 | 0.22 | 0.22 | 0.18 | 0.21 | 0.18 | 0.23 | 0.30 | 0.26 |
| 5  | 0.56 | 0.47 | 0.43 | 0.51 | 0.44 | 0.36 | 0.43 | 0.36 | 0.45 | 0.56 | 0.48 |
| 6  | 1.45 | 1.13 | 1.18 | 1.43 | 1.05 | 0.81 | 1.04 | 0.82 | 1.07 | 1.42 | 1.26 |
| 7  | 1.19 | 1.01 | 0.91 | 1.12 | 0.94 | 0.73 | 0.93 | 0.74 | 0.97 | 1.17 | 1.06 |
| 8  | 0.44 | 0.36 | 0.36 | 0.45 | 0.33 | 0.26 | 0.32 | 0.26 | 0.35 | 0.43 | 0.37 |
| 9  | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.08 |
| 10 | 0.31 | 0.29 | 0.23 | 0.27 | 0.29 | 0.23 | 0.28 | 0.24 | 0.29 | 0.32 | 0.28 |
| 11 | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |



2.9.2 相似度分析 采用 EXCEL 软件进行相似度计算,以相关系数来进行相似度评价,结果见表 4。表明不同产地的广金钱草相似度较高。

表 4 广金钱草指纹图谱相似度结果

| Table 4 Similarity of HPLC Fingerprint of <i>Desmodium styracifolium</i> |       |      |       |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| 编号                                                                       | 相似度   | 编号   | 相似度   |
| 样 1                                                                      | 0.988 | 样 7  | 0.998 |
| 样 2                                                                      | 0.999 | 样 8  | 0.973 |
| 样 3                                                                      | 0.992 | 样 9  | 0.999 |
| 样 4                                                                      | 0.990 | 样 10 | 0.990 |
| 样 5                                                                      | 0.998 | 样 11 | 0.998 |
| 样 6                                                                      | 0.972 |      |       |

两种方法处理结果基本一致,但由于分析方法不完全相同,在某些结果上还有所不同。本实验的相似度计算采用了 EXCEL 表进行了相关系数的计算,补充聚类分析以更加精确地判断 11 批广金钱草间的相似关系与分类状况。

3 讨论

3.1 色谱条件及系统适用性考察 取广金钱草药材供试品溶液进行紫外扫描,结果表明在 272 nm 和 340 nm 有较强的吸收且在 272 nm 有最大吸收。检测波长在 272 nm 时,色谱峰较多,基线平稳,各峰分离度较好。试验过程中选择了多种流动相系统:甲醇-水,乙腈-水,乙腈-1%冰醋酸水溶液,乙腈-甲醇-水梯度洗脱几种方式,并对梯度洗脱程序进行优化,结果表明以乙腈-水-甲醇为流动相梯度洗脱为最佳,各色谱峰分离度较好,峰型尖锐,保留时间适中。试验中分别考察了 0.8 mL/min 和 1.0 mL/min 两种流速,结果表明以 1.0 mL/min 为流速各色谱峰分离度较好,保留时间适中。

3.2 提取溶剂的选择 实验中比较了 30% 甲醇,60% 甲醇和甲醇超声提取样品,结果以 60% 甲醇超声提取的样品杂质少,含量高。

3.3 内标物的选择 广金钱草的主要成分为黄酮,目前其含有的黄酮类化合物已知的有 5 种:异牡荆苷、vicenir-1

vicenir-2、夏佛塔苷和异荭草苷,均属于黄酮类衍生物。本实验选择了槲皮素、芹菜素、木犀草素、牡荆素、芦丁等与其成分相似的对照品,考察了供试品不加内标与加入内标的对比图谱,发现芦丁在共有峰出峰处无干扰,结果采用以芦丁为内标物,并以其色谱峰为参照峰进行谱图分析。

3.4 不同用药部位的考察 广金钱草为地上部分入药,本试验对其茎和叶分别制备供试品溶液,检测指纹图谱,结果茎和叶均有 11 个共有峰,但叶的含量明显高于茎(见图 4、图 5),为药典中提出的“叶多色绿者佳”提供了理论依据。

3.5 易混品的指纹图谱比较 广金钱草混淆品种繁多,本试验首次采用指纹图谱对广金钱草、连钱草、积雪草和金钱草进行鉴别(见图 6),用整体图形的形式直观的对其进行了鉴别。

实验结果表明,通过指纹图谱整体图形、共有特征峰、相对保留时间等参数可对药材进行鉴定,通过各共有峰相对峰面积可对药材的内在质量进行评价。11 批广金钱草药材指纹相似度结果可以看出,不同来源的广金钱草指纹图谱相似度较高,均大于 0.9。但是,各峰相对峰面积有一定的差异,说明药材之间的内在质量是有差异的,提示药材应在定产地的前提下才能保证药品内在质量的一致性。同时说明单以一个或几个成分含量为主的质量控制方法已不能真正反映中药材质量,而利用指纹图谱对药材进行综合、宏观的评价可获得全面反映药材特性的色谱分离图,制定出系统性、特征性和稳定性均较好的药材指纹图谱,为中药材的质量评价提供了全面的分析方法。

参考文献:

[1] 中国药典 2005 年版一部 [S]. 2005

[2] 曹进,叶兆波,车镇涛. 广金钱草与金钱草指纹图谱比较 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1248-1250.

[3] 李小燕,潘洪平. 广西粉葛药材高效液相色谱指纹图谱的研究 [J]. 中成药, 2006, 28(9): 1249-1253.

河南蒲公英 RP-HPLC 指纹图谱研究

李喜凤<sup>1</sup>, 师绘敏<sup>2</sup>, 万焱<sup>1</sup>  
(1. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008; 2. 河南商业高等专科学校营销系, 河南 郑州 450008)

关键词: 蒲公英; RP-HPLC; 指纹图谱

摘要: 目的: 建立河南蒲公英药材的高效液相标准指纹图谱。方法: 采用 RP-HPLC 法, 测定了 40 个不同蒲公英样品。流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钠缓冲盐溶液 (pH = 3.8), 梯度洗脱, 记录色谱图 80 min, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 323 nm, 柱温 35℃。结果: 标示出 9 个共有指纹峰。结论: 该方法简便、可靠、重现性好, 可用于蒲公英药材的鉴定与评

收稿日期: 2007-09-14  
基金项目: 河南省科技厅重点科技攻关项目 (课题编号: 062306100)。  
作者简介: 李喜凤 (1952-), 女, 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药新药及质量标准。电话: 0371-65575823。